Izolacija i molekularna karakterizacija gena antimikrobne rezistencije u vrstama Enterobacter izoliranih iz školjkaša

Delić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:125851

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Science

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

Marija Delić

Izolacija i molekularna karakterizacija gena antimikrobne rezistencije u vrstama *Enterobacter* izoliranih iz školjkaša

Diplomski rad

Split, 2015.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

Izolacija i molekularna karakterizacija gena antimikrobne rezistencije u vrstama *Enterobacter* izoliranih iz školjkaša

Diplomski rad

STUDENTICA:

Marija Delić

MENTORICA:

Izv. prof. dr. sc. Mirjana Skočibušić

«Ovaj rad izrađen u Splitu, pod mentorskim vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirjane Skočibušić, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije»

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. sc. Mirjani Skočibušić na stručnom vodstvu, neposrednom zalaganju i trudu te iznad svega ljudskoj podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Također se zahvaljujem prof. dr.sc. Mati Šantiću i prof. dr. sc. Jasni Puizini za brižljiv pregled i korekciju rada.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Mirku Ruščiću na mentorskom vodstvu metodičkog dijela rada.

Hvala i ostalim djelatnicima Zavoda za biologiju koji su mi pomogli pri izvedbi rada.

Na kraju se želim posebno zahvaliti mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci, razumijevanju i strpljenju. Bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.

Marija Delić

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno matematički fakultet
Odjel za biologiju Diplomski rad

Izolacija i molekularna karakterizacija gena antimikrobne rezistencije u vrstama *Enterobacter* izoliranih iz školjkaša

Marija Delić

Teslina 12, 21 000 Split

Cilj rada: Odrediti fenotipsku osjetljivost vrsta *Enterobacter* izoliranih iz školjkaša u priobalnom području Kaštelanskog zaljeva, te molekularnim metodama identificirati gene koji kodiraju proširenu spektar beta-laktamaza (ESBL) i beta-laktamaze AmpC kako bi se bolje razumjela evolucija i širenje rezistencije na nove antibiotike iz skupine cefalosporina. **Metode**: Za identifikaciju vrsta korištena je serija biokemijskih testova, uključujući indol, metil crvenilo, Voges-Proskauer, citrat test, te oksidaza test. Ispitivanje osjetljivosti na antibitike potvrđeno je primjenom disk-difuzijske metode. Za fenotipsko određivanje beta-laktamaza ESBL i AmpC korištena je metoda dvostrukog diska. Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) identificirani su geni koji kodiraju β-laktamaze proširenog spektra. **Rezultati**: Od ukupno 54 izolata, geni koji kodiraju ESBL su identificirani u 15 izolata, dok su kod 10 izolata identificirani geni AmpC. **Zaključak**: Rezultati ukazuju na visoki stupanj rezistencije na antibiotike vrsta iz roda *Enterobacter*. Stoga je potrebno daljnje aktivno praćenje istih u cilju očuvanja ekosustava mora i zdravlja ljudi.

(32 stranica, 11 slika, 4 tablice, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: beta-laktamaze, rezistencija, antibiotici, Gram-negativne bakterije

Voditeljica: Izv. prof. dr. sc. Mirjana Skočibušić

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Mirjana Skočibušić

Prof. dr. sc. Mate Šantić

Prof. dr. sc. Jasna Puizina

Rad prihvaćen: 10. srpnja 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Isolation and molecular characterization of antimicrobial resistance genes in *Enterobacter* species isolated from shellfish

Marija Delić

Teslina 12, 21 000 Split

Object of the paper: Determine the phenotype susceptibility of *Enterobacter sp.* isolated from shellfish in Kaštela Bay, and performing molecular methods identify the resistance genes responsible for producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and beta-lactamase AmpC in order to understand the resistance of these bacteria to cephalosporines. **Methods**: For bacterial identification we performed serial of biochemical tests including indol, methyl red, Voges-Proskauer, citrate test and oxidase test. Antibiotic resistance was examined by the disc-diffusion method. Afterwards, for phenotype detection of beta-lactamase ESBL and AmpC, the synergistic tests were used. By the polymerase chain reaction (PCR) method we have identified genes ESBL and AmpC. **Results**: Out of total 54 isolates, we have identified genes ESBL among 15 isolates, and genes AmpC in 10 isolates. **Conclusion**: Results point to high prevalence of antimicrobial resistance in *Enterobacter* sp. For that reason, it is of crucial need to shadow these bacteria, for the purpose of sea ecosystem preservation and for the human health benefit.

(32 pages, 11 figures, 4 tables, 31 references, original in: Croatian language)

Key words: beta-lactamases , resistance, antibiotics, Gram-negative bacteria

Supervisor: Izv. prof. dr. sc. Mirjana Skočibušić

Reviewers: Izv. prof. dr. sc. Mirjana Skočibušić

Prof. dr. sc. Mate Šantić

Prof. dr. sc. Jasna Puizina

Thesis accepted: 10 July 2015

SADRŽAJ:

1. UVOD……..….1

2. OSNOVNA OBILJEŽJA VRSTA *ENTEROBACTER* I UČESTALOST REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE 4

3. CILJEVI RADA..... 8

4. MATERIJALI I METODE 9

4.1. Opis mjesta istraživanja i sakupljanja uzoraka za analizu …..……...……..9

4.2. Izolacija i identifikacija vrsta *Enterobacter* 11

4.3. Biokemijska identifikacija vrsta *Enterobacter*..... 12

4.4. Određivanje osjetljivosti na antibiotike 13

4.5. Identifikacija gena koji kodiraju beta laktamaze proširenog sprektra pomoću PCR tehnike 17

5. REZULTATI..... 19

5. 1. Rezultati biokemijskih obilježja identificiranih vrsta *Enterobacter* 19

5. 2. Rezultati fenotipske osjetljivosti na antibiotike identificiranih vrsta *Enterobacter*..... 21

5. 3. Rezultati učestalosti i postotak rezistencije *Enterobacter* izolata na antibiotike 22

5. 4. Rezultati molekularne identifikacije gena u izolatima *Enterobacter* koji produciraju ESBL 23

6. RASPRAVA 26

7. ZAKLJUČAK 28

8. LITERATURA 29

METODIČKI DIO

1. **UVOD**

Ljudi su od davnina koristili vodu uglavnom za piće i eventualno za navodnjavanje. S napretkom čovječanstva i povećanjem broja stanovništva na Zemlji, povećavala se potreba za vodom. Voda postaje temeljem razvoja moderne ljudske civilizacije, a gospodarski interesi za vodom postaju sve veći.

Kombinirani efekti urbanizacije, industrijalizacije i rasta stanovništva mijenjaju prirodni okoliš i uzrokuju promjene u hidrološkom režimu te dovode do narušavanja ekološke ravnoteže priobalnih vodenih ekosustava. Priobalna područja su izuzetno osjetljivi prostori velike ekološke, socijalne i kulturne vrijednosti i spadaju među najvrednija gospodarska i prirodna bogatstva Republike Hrvatske. Upravo priobalna područja najgušće su naseljeni i najintenzivnije korišteni prostori na Zemlji. Procjenjuje se da više od 60% svjetske populacije živi u relativno uskom obalnom pojasu, a predviđa se da će taj postotak 2020. godine iznositi i do 75%.

Priobalna područja imaju višestruke prednosti za život ljudi prije svega more je izvor hrane; pomorski promet najjeftiniji je način transporta; obalna područja imaju blažu i ugodniju klimu nego njihovo neposredno kopneno zaleđe. Resursi i pogodni uvjeti probalnih područja osnova su za brojne djelatnosti: od industrije i proizvodnje energije; preko ribarstva i marikulture koji koriste golemo bogatstvo i proizvodni potencijal samoobnovljivih morskih resursa; do turizma koji iskorištava njegov estetski i zdravstveni potencijal. Međutim, priobalna područja su izuzetno osjetljivi prostori velike ekološke vrijednosti u kojem se odvijaju dinamični prirodni procesi koji nastaju uzajamnim djelovanjem mora i kopna.

Najveći broj neželjenih promjena u moru nastaje kao posljedica ispuštanja industrijskih i komunalnih otpadnih voda bez prethodnog pročišćavanja. Na taj način se dovodi u pitanje zdravstvena i estetska kakvoća obalnih voda, koje su vrlo važne za priobalne zemlje Mediterana kojima je turizam jedna od najvažnijih gospodarskih grana (Wollenberger i sur., 2000). Istraživanja u raznim zemljama ukazuju na visoke koncentracije antibiotika u obalnim vodama u koje dospijevaju bolničkim ispustima, gradskim i industrijskim otpadnim vodama (Kümmerer, 2004). U more ovim putem dospijevaju i različite skupine mikroorganizama od kojih su neki patogeni, uzročnici širokog spektra infekcija ljudi i životinja. Prisustvo takvih mikroorganizama

u moru predstavlja mikrobiološko onečišćenje, te se na temelju stupnja onečišćenja definira mikrobiološka ili sanitarna kvaliteta mora (Edge i Hill, 2005).

Antibiotici su jedan od najvažnijih terapijskih otkrića u povijesti medicine koji su promijenili tijek i ishod velike većine bakterijskih infekcija. Djelotvornost antibiotika i mogućnost kontroliranja bakterijskih infekcija osnove su na kojima počivaju brojna dostignuća moderne medicine. Nažalost, rezistencija bakterija, potaknuta širokom i učestalom primjenom antimikrobnih lijekova predstavlja danas jedan od najznačajnijih medicinskih problema (Tambić Andrašević, 2009). Naime, Hrvatska pripada skupini zemalja s najvećim stupnjem rezistentnih kliničkih sojeva osobito onih iz porodice Enterobacteriaceae. Zbog toga a s obzirom na rastući problem rezistencije bakterija na antibiotike u Hrvatskoj a i diljem svijeta, od izuzetne je važnosti poznavanje osjetljivosti pojedinih potencijalnih uzročnika infektivnih bolesti kao i njihovih molekularnih mehanizma, te procjene potencijala prijenosa gena rezistencije na filogenetski nesrodne mikroorganizme u vlastitoj sredini, zbog što racionalnijeg pristupa u terapiji, te ujedno i učinkovitijoj zdravstvenoj i zaštiti morskih ekosustava.

Veliki broj istraživanja o mehanizmima rezistencije bakterija na antibiotike, te raznolikosti njihovih gena bila su uglavnom usmjerena na kliničke izolate, međutim spoznaje o stupnju rezistencije na antibiotike kao i raznolikost gena koji kodiraju rezistenciju u izolatima iz okoliša su nedostatne. Istraživanja u raznim zemljama ukazuju na visoke koncentracije antibiotika i značajnu prisutnost bakterija rezistentnih na antibiotike u vodama koje su zagađene bolničkim ispustima, te gradskim i industrijskim otpadnim vodama (Kümmerer, 2004; Tacão i sur., 2012). Bakterije iz okoliša često su prepoznate kao višestruko rezistentne, i ponekad tolerantne na visoke doze antibiotika (Bhullar i sur., 2012), dok su vodeni ekosustavi koji su pod snažnim utjecajem ljudskih aktivnosti prepoznati kao žarišne točke koje utječu na rasprostranjivanje rezistentnih bakterijskih populacija i njihovih gena rezistencije (Canton i sur., 2012). Detekcija i brza identifikacija rezistentih vrsta bakterija koje obitavaju u okolišu je ključan korak u evaluaciji potencijalnih rezervoara rezistentnih bakterija u okolišu (Girlich i sur., 2011; Tacão i sur., 2012).

Tijekom posljednjeg desetljeća osobitu pozornost s epidemiološkog aspekta predstavljaju pojave sve većeg broja infektivnih oboljenja vezanih uz konzumiranje morske faune, osobito školjkaša (Janda i Abbott, 2010; WHO, 2010). Naime, zbog svog sesilnog načina života vezanog

za sediment i filtriranje morske vode, školjkaši i drugi organizmi bentosa imaju značajnu ulogu u ekologiji i prijenosu mnogih mikroorganizama, što značajno povećava rizik od infekcija uslijed konzumacije nedostatno termički obrađenog ili pak sirovog mesa. Također, školjkaši mogu u sebi akumulirati sojeve rezistentne na antibiotike (Aravena-Roman i sur., 2012; Maravić i sur., 2012; Ottaviani i sur. 2006), što dodatno povećava rizik za ljudsko zdravlje ali i ukazuje i na ulogu školjkaša kao mogućih rezevoara gena rezistencije.

S toga su u ovom radu po prvi put provedena istraživanja u cilju određivanja fenotipske osjetljivosti *Enterobacter sp*. izoliranih iz školjkaša u priobalnom području Kaštelanskog zaljeva, te molekularnim metodama su identificirani, pored beta-laktamaze proširenog spektra, geni koji kodiraju beta-laktamaze AmpC kako bi se bolje razumjela evolucija i širenje rezistencije na novije antibiotike iz skupine cefalosporina, te procijenila moguća uloga onečišćenog mora kao rezervoara u nastanku i širenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim sojevima koji simultano pored beta-laktamaza ESBL produciraju i beta-laktamaze AmpC.

Vrste *Enterobacter* pripadaju porodici Enterobacteriaceae. To su Gram-negativne bakterije široko rasprostranjene u prirodi uključujući tlo, vodu i kanalizacijske sustave, a također su i dio normalne mikroflore gastrointestinalnog sustava čovjeka i životinja (Mezzatesta i sur., 2012). Vrste *Enterobacter sp.* prirodno su osjetljive na antibiotike, no njihova nekontrolirana i prevelika upotreba dovela je do razvoja rezistencije na široki spektar antibiotika. Tijekom posljednjeg desetljeća vrste roda *Enterobacter* se pojavljuju kao značajni uzročnici sve većeg broja oportunističkih infekcija.

2. OSNOVNA OBILJEŽJA VRSTA *ENTEROBACTER* I UČESTALOST REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE

Rod *Enterobacter* prvi put su prije 50 godina opisali Hormaeche i Edwards 1960. godine (Hoffmann i Roggenkamp, 2003; Morand i sur., 2009). Vrste *Enterobacter* su Gram-negativni štapići iz porodice Enterobacteriaceae koje uzrokuju široki spektar infekcija uključujući infekcije mokraćnog sustava, kože i probavnog sustava. To su pokretne bakterije, široko rasprostranjene u prirodi pa ih tako možemo naći u tlu i kanalizacijskim odvodima, a isto tako su i dio normalne mikroflore gastrointestinalnog sustava čovjeka i životinja (Mezzatesta i sur., 2012). Metabolički su vrlo aktivne, fermentiraju glukozu uz produkciju plina, arabiozu, celobiozu, maltozu, manitol, manozu, ramnozu, trahalozu i ksilozu, reduciraju nitrate u nitrite, indol su negativne, ne stvaraju H_2S i pigmente (Gurtler i sur., 2005).

Fenotipska identifikacija vrsta koje pripadaju ovom taksonu je kopleksna i i nije uvijek vjerodostojna, stoga je potrebno provoditi dodatne molekularne metode identifikacije. Prema najnovijoj klasifikaciji rodu *Enterobacter* pripadaju 22 vrste. Biokemijske i molekularne metode provedene na *E.cloaceae* su pokazale genomsku heterogenost među šest vrsta ovog roda: *E.cloaceae*, *E.asburiae*, *E.hormaechei*, *E.kobei*, *E.ludwigii* i *E.nimipressuralis*. Ovih šest vrsta pripada takozvanom *E.cloaceae* kompleksu zbog sličnost genomske DNA koja varira između 61-67% (Hoffmann i Roggenkamp, 2003).

Tijekom posljednjih desetljeća vrste roda *Enterobacter* se pojavljuju kao značajni uzročnici nozokomijalnih infekcija u jedinicama intenzivne njege (Saunders i Paine-Sanuders, 1997). Studija provedena na nazokomijalnim infekcijama koje uzrokuju bakterijemiju u razdoblju od 1995-2002. godine je uvrstila *Enterobacter* među deset najučestalijih izoliranih nazokomijalnih patogena, a njihova učestalost u jedinicama intenzivne njege je još i veća (Wisplinghoff i sur., 2004). Razlog zašto je pojava infekcija uzrokovanih *Enterobacter* zabrinjavajuća jest zato što su vrste ovog roda prirodno osjetljive na antibiotike, no njihova nekontrolirana i prevelika upotreba dovela je do razvoja rezistencije na široki spektar antibiotika koji se danas najčešće koriste u konvencionalnoj medicini. Danas se sve češće uočavaju vrste koje stječu otpornost prema većini antibiotika, naročito među kliničkim izolatima. Na osjetljive sojeve su djelotvorni aminoglikozidi, betalaktamski antibiotici (osim penicilina), kloramfenikol,

tetraciklini, kinoloni i trimetroprim-sulfomatoksazol. Kod ovih bakterija vrlo je značajna stečena otpornost prema antibioticima koja se prenosi plazmidima. U terapiji infekcija koje uzrokuju *Enterobacter sp.* obično se koriste karbapenemi i fluorokinoloni. Međutim, već je zabilježena rezistencija prema oba antibiotika (Gurtler i sur., 2005).

U Gram-negativnih bakterija otpornost na beta-laktamske antibiotike je povezana s proizvodnjom β-laktamaza (Bush i Jacoby, 2010). Zbog svoje niske toksičnosti i visoke djelotvornosti β-laktamski antibiotici se najčešće upotrebljavaju u kliničkoj praksi, te najviše zabrinjava razvoj rezistencije na njih. Jedan od obrambenih mehanizama kod bakterija je prisustvo beta-laktamaza-enzima koji su odgovorni za rezistenciju na beta-laktamske antibiotike. Osnovni mehanizam djelovanja beta-laktamskih antibiotika (penicilina, cefalosporina, karbapenema i monobaktama) je inaktivacija penicilin vežućih proteina (PBP), koji su neophodni u sintezi peptidoglikana. Primjerice, cefalosporini ometaju sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije tako što ometaju djelovanje PBP-a, a PBP omogućuje završnu transpeptidaciju u sintezi peptidoglikana. Na ovaj način se prekida sinteza stanične stijenke u bakterija, aktiviraju se autolitičke hidrolaze, a krajnji rezultat je liza bakterijske stanice.

Na temelju molekularne strukture klasifikacijom prema Ambleru ti su enzimi podjeljeni u četiri klase na A, B, C i D β-laktamaze (Tablica 1), dok se prema spektru djelovanja dijele na penicilinaze, cefalosporinaze i karbapenemaze i svrstane su u 16 grupa prema Bush-Jacoby-Medeiros klasifikaciji (Bush i Jacoby, 2010). Prema učestalosti i broju tipova, klinički je najznačajnija klasa A β-laktamaza u koje spadaju β-laktamaze širokog spektra (penicilinaze) te β-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β-lactamases*, ESBL). β-laktamaze širokog spektra (TEM-1, -2, i SHV-1) su kodirane plazmidnim genima, a posreduju rezistenciju na peniciline i uži spektar cefalosporina. Beta-laktamaze ESBL su odgovorne za rezistenciju na sve β-laktamaske antibiotike, uključujući peniciline, oksimino-cefalosporine (III i IV generacija cefalosporina) i monobaktame, osim karbapenema. Većina β-laktamaza ESBL je nastala mutacijom plazmidnih gena koji kodiraju β-laktamaze širokog spektra TEM-1, TEM-2 i SHV-1. Danas je TEM-1 najčešće identificirana β-laktamaza u Gram-negativnih bakterija. Ostale β-laktamaze širokog spektra su također rasprostranjene u Enterobacteriaceae, ali u odnosu na TEM-1 su ipak manje učestalosti, i mogu biti kodirani genima na plazmidu ili na kromosomu (Bush i Jacoby, 2010).

Tablica 1. Podjela i karakteristike β-laktamaza

Bush-Jacoby grupe (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros grupe (1995)	Molekulame klase (podklase)	Substrati	Inhibicija sa		Karakteristike	Najznačajniji enzimi
				CA ili TZB[a]	EDTA		
1	1	C	Cefalosporini	Ne	Ne	Bolja hidroliza cefalosporina nego benzilpenicilina; hidroliza cefamicina	*E. coli* AmpC, ACT-1,CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NU[b]	C	Cefalosporini	Ne	Ne	Povećana hidroliza oksimino-β-laktama	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilini	Da	Ne	Bolja hidroliza benzilpenicilina od cefalosporina	PC1
2b	2b	A	Penicilini, raniji cefalosporini	Da	Ne	Slična hidroliza benzilpenicilina i cefalosporina	TEM-1,TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Prošireni spektar cefalosporina, monobaktami	Da	Ne	Povećana hidroliza oksimino-β-laktama	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilini	Ne	Ne	Rezistencija na klavulansku kiselinu, sublaktami tazobaktam	TEM-30, SHV-10
2ber	NU	A	Prošireni spektar cefalosporina, monobaktami	Ne	Ne	Povećana hidroliza oksimino-βlaktama; rezistencija na klavulansku kiselinu, sublaktami tazobaktam	TEM-50
2c	2c	A	Karbenicilin	Da	Ne	Povećana hidroliza karbenicilina	PSE-1,CARB-3
2ce	NU	A	Karbenicilin, cefepim	Da	Ne	Povećana hidroliza karbenicilina i cefepima	RTG-4
2d	2d	D	Cloksacilin	V[c]	Ne	Povećana hidroliza kloksacilina i oksacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NU	D	Prošireni spektar cefalosporina	V	Ne	Hidroliza kloksacilina ili oksacilina i oksimino-β-laktama	OXA-11, OXA-15
2df	NU	D	Karbapenemi	V	Ne	Hidroliza kloksacilina ili oksacilina i karbapenema	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Prošireni spektar cefalosporina	Da	Ne	Hidroliza cefalosporina, inhibicija sa klavulanskom kiselinom	CepA
2f	2f	A	Karbapenemi	V	Ne	Povećana hidroliza karbapenema i oksimino-β-laktama	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Karbapenemi	Ne	Da	Siroki spektar hidrolize uključujući karbapeneme ali ne monobaktame	IMP-1, VIM-1, IND-1, CcrA
3b	3	B (B3) B (B2)	Karbapenemi	Ne	Da	Prevladava hidroliza karbapenema	L1, GOB-1 CphA, Sfh-1

CTX-M enzimi se počinju širiti 1990-ih godina prošlog stoljeća, najprije među izolatima Enterobacteriaceae, da bi tijekom posljednjeg desetljeća njihovo širenje doseglo epidemijske razmjere i postalo fenomen u smislu epidemiologije širenja gena. Danas su CTX-M ESBL najčešće identificirani ESBL enzimi kod Enterobacteriaceae u svijetu, među kojima je *E. coli* najznačajnija (Cantón et al., 2012). Zanimljivo je da CTX-M nisu nastali mutacijom β-laktamaza širokog spektra, već su kodirani genima na plazmidu koji potječu od kromosomskih gena bakterijskih vrsta *Kluyvera* rasprostranjenih u okolišu. (Poirel et al., 2012).

Klasa C uključuje β-laktamaze AmpC (cefalosporinaze) koje hidroliziraju i širi spektar cefalosporina, ali za razliku od ESBL enzima, nisu inhibirane klavulanskom kiselinom. Najčešće su kromosomski kodirane kod velikog broja Gram-negativnih bakterija, gdje je njihova ekspresija inducibilna naročito kod vrsta *Enterobacter* spp. Naime, cefalosporini prve generacije, te ampicilin i amoksicilin induciraju β-laktamaze AmpC i podložni su hidrolizi od strane tih enzima, pa su kao posljedica toga AmpC inducibilini sojevi rezistentni na te antibiotike. S druge strane, cefalosporini treće generacije i monobaktami su slabi induktori pa su zbog toga ovakvi sojevi uobičajeno osjetljivi na ove antibiotike ako ne postoje drugi mehanizmi rezistencije. Nadalje, širenje gena koji kodiraju za β-laktamaze proširenog spektra kod patogenih bakterija je značajno zato što su oni uglavnom locirani na plazmidu, što opet uzrokuje rezistenciju i na druge antimikrobne lijekove, te rezultira jako suženim izborom terapije.

S druge strane, novija istraživanja ukazuju da mikroorganizmi u onečišćenim vodenim ekosustavima izloženi selektivnom pritisku nepovoljnih fizikalno-kemijskih činitelja, te da imaju izvanrednu sposobnost adaptacije na nepovoljne uvjete okoliša (Zhang i sur., 2009; Baquero i sur., 2008). Tijekom procesa adaptacije dolazi do simultane ekspresije ne samo gena rezistencije na antibiotike nego i drugih gena smještenih na istom genetičkom elementu koji kodiraju enzime za razgradnju toksičnih tvari i teških metala te virulenciju (Baquero i sur., 2008).

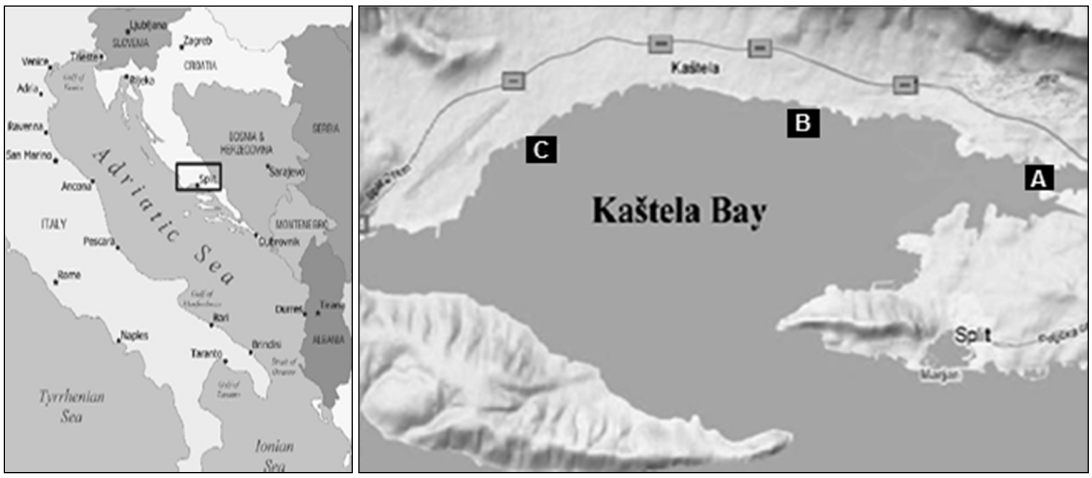
3. CILJEVI RADA

- Istražiti sastav bakterijskih zajednica u školjkašima sakupljenim na tri postaje u priobalnom području Kaštelanskog zaljeva koji je onečišćen industrijskim i gradskim otpadnim vodama s posebnim naglaskom na značaj bakterija iz roda *Enterobacter*.
- Izolirati i identificirati *Enterobacter sp.* iz školjkaša sakupljenim u blizini ispusta fekanih otpadnih voda što je od velikog značaja u u cilju procjene mogućih posljedica na zdravlje ljudi i morske faune.
- Odrediti fenotipsku osjetljivosti bakterija roda *Enterobacter* na antibiotike.
- Molekularnim metodama identificirati raznolikost gena koji kodiraju beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) kako bi dobili bolje spoznaje o rasprostranjenosti i molekularnoj raznolikosti gena, te kako bi se bolje razumjelo nezaustavljivo širenje rezistencije na antibiotike koje postaje problem svjetskih razmjera.
- Uočavanje stupnja onečišćenja mora i njegova uloga u širenju i razmjeni gena unutar bakterijskih zajednica te procjenu mogućeg stupanja opasnosti za ljude tijekom rekreativnih aktivnosti ili konzumiranja hrane iz mora.
- Istraživanje u ovom radu pomoći će u proučavanju i identifikaciji vrsta *Enterobacter* i njihovih gena odgovornih za rezistenciju te mogućeg prijenosa gena na kliničke patogene.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Opis mjesta istraživanja i sakupljanja uzoraka za analizu

Istraživanje i sakupljanje uzoraka morske vode i školjkaša je provedeno u priobalnom području Kaštelanskog zaljeva koji je smješten u središnjem dijelu Jadranskog mora. Uzorci su sakupljeni na tri postaje (Slika 1.) u Kaštelanskom zaljevu: postaja A (Kaštel Sućurac), postaja B (Kaštel Gomilica), postaja C (Resnik). Odabir postaja je proveden s ciljem da se obuhvate područja koja su pod snažnim utjecajem gradskih i industrijskih otpadnih voda.



Slika 1. Prikaz postaja u Kaštelanskom zaljevu

Kaštelanski zaljev je smješten u srednjem dijelu Jadranskog mora u kojem je provedeno istraživanje. Iznad Kaštela se u smjeru zapad-istok proteže planina Kozjak (779 m), a nešto dalje prema istoku i planina Mosor (1339 m). Kaštelanski zaljev, južna granica Kaštelanskoga polja, predstavlja potonulu depresiju između spomenutih planina na sjeveru i poluotoka Marjana i otoka Čiova na jugu. Rub između kopna i mora prate plićaci s čestim žalom, hridima i minijaturnim otocima. U geološkom smislu prevladavaju vapnenac i fliš. Fliš ne prelazi visinu od 400 m i njegove blage padine, osobito prema moru, prekrivene su obradivim plodnim tlima. Izvori vode izbijaju upravo na liniji dodira fliša i vapnenca, te su Kaštela bogata podzemnim i nadzemnim vodotokovima. Rijeka Jadro se ulijeva u istočni dio zaljeva i ona je najvažniji izvor slatke vode, a potok Pantana (kod Trogira) u zapadni dio zaljeva. Njegovu vodu karakterizira

visoki omjer dušika i fosfora (N/P). Područje istraživanja se proteže oko 20 km uzduž Kaštelanskog zaljeva koji ima površinu 61 km2, a prosječnu dubinu 23m. (Orlić, 2007.)

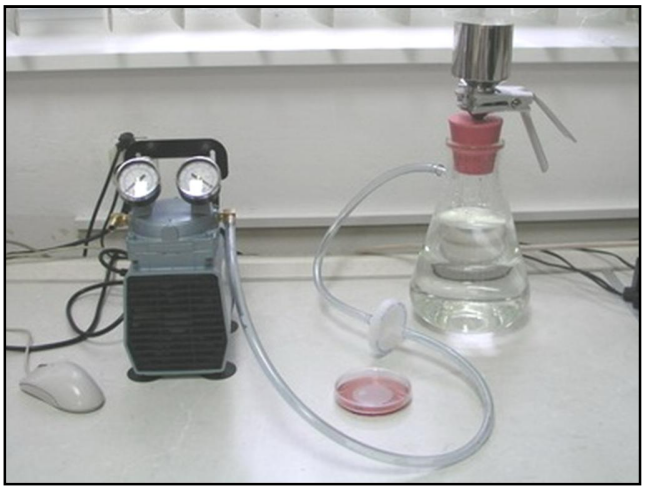
Broj stanovnika u području Kaštelanskog zaljeva je u kratkom roku utrostručen (oko 35 000 stanovnika). Obzirom da se komunalna infrastruktura odnosno izgradnja vodoopskrbe i kanalizacijske mreže nije paralelno značajnije razvijala, u ovom dijelu Jadrana pojavila se i najveća koncentracija zagađenja. Na tom području se najveći dio otpadnih voda sakupljao u septičke jame, ostale otpadne vode su se direktno ili indirektno bez pročišćavanja ispuštale na više mjesta direktno u priobalno more. Hrvatski sabor je 1994. godine proglasio Kaštelanski zaljev crnom točkom zagađenja Jadrana (Kušpilić, 2001.).

Uzorci morske vode i školjkaša su sakupljani tijekom lipnja i srpnja 2014. godine. Prosječna temperatura mora se kretala od 22-24ºC. Uzorci morske vode za mikrobiološka ispitivanja su se uzimali neposredno uz obalu pomoću sterilne boce od 3L na dubini 20-30cm. Na istim postajama također je sakupljeno 10 do 25 jedinki dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) približno jednake dužine ljušture koje su pohranjene u čiste i sterilne plastične vrećice. Nakon sakupljanja svi uzorci su pohranjeni u hladnjak na 4ºC i u kratkom roku prevezeni su u laboratorij.

Nakon dolaska u laboratorij, dagnje su oprane pod tekućom vodom radi uklanjanja obraštaja i nečistoća a zatim otvorene sterilnim skalpelom. Metodom razrjeđenja pripremljeno je početno razrijeđenje tako da je odvagana masa 25 g mekog tkiva i intervalvularne tekućine u 225 ml sterilne destilirane vode. Od inicijalnog razrjeđenja napravljen je niz razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-6} i po 0,1 ml svakog razrjeđenja nasijan je na eosin- metilen- plavi (EMB) agar i na MacConkey agar (BD Becton Dickinson, Sparks, MD), zbog toga što takve vrste agara omogućuju preliminarno grupiranje Enterobacteriaceae na temelju fermentacije laktoze, te služe za određivanje broja bakterija. Nakon inkubacije 18-24 sata na 37°C, sve porasle laktoza pozitivne kolonije na EMB i MacConkey agaru su zabilježene kao potencijalni *Enterobacter* te su presijane na trypticase soja agar i potom čuvane na 4°C, zbog budućih biokemijskih analiza i istraživanja na molekularnoj razini.

4.2. Izolacija i identifikacija vrsta *Enterobacter sp.*

Sakupljeni uzorci morske vode su filtrirani primjenom metode membranske filtracije. Metoda membranske filtracije je danas najpovoljnija metoda za mikrobiološku analizu voda, jer je praktična, jednostavna i ekonomična, ponovljiva, omogućuje kvantitativno određivanje broja mikroorganizama. Zasniva na filtraciji poznatog volumena morske vode kroz membranske filtere čiji promjer pora osigurava zadržavanje bakterija. Na držač filtera (poroznu ploču metalnog filtarskog lijevka) se stavi membranski filter s odgovarajućim promjerom pora, i uzorak se profiltrira. Mikroorganizmi iz uzorka zaostaju na membranskom filteru. Tada se membranski filter skine s držača, stavi na hranjivu podlogu i inkubira. Nutrijenti i metaboliti se izmjenjuju kroz sustav pora membranskog filtera. Kolonije, koje se razvijaju na površini membranskog filtera tijekom inkubacije, se broje i preračunavaju s obzirom na volumen uzorka. Za filtraciju je korišten filtracijski uređaj tvrtke Pall Corporatin-Life Sciences (Slika 2), filteri promjera 47 mm i veličine pora 0.45 µm. Nakon filtracije različitih volumena (10 mL, 50 mL, 100 mL), filteri su postavljeni na na eosin- metilen- plavi (EMB) i na MacConkey agar (BD Becton Dickinson, Sparks, MD) i inkubirani na 37°C tijekom 24 sata.



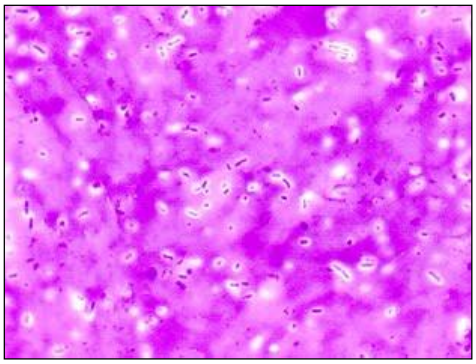
Slika 2. Uređaj za membransku filtraciju

Nakon 24 sata inkubacije na membranama su izrasle kolonije onih bakterija koje su bile u uzorcima. Čiste kulture su izolirane radi smanjenja veličine populacije kako bi nakon inokulacije

pojedinačne kolonije bile dovoljno razdvojene. Sterilnom mikrobiološkom ezom se zahvati mali dio kolonije, priljubi se vrh uz rub Petrijeve posudice, a potom nekoliko puta se razvuče po površini hranjive podloge. Okrene se Petrijeva posudica za 90°. Potom se dotakne kraj nanesene kulture i razvuče nekoliko puta. Ponovo se okrene posudica i ponovi postupak. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima. Nakon inokulacije izoliranih kultura Petrijeve posude su stavljene u inkubator na 37 °C tijekom 24 sata.

Porasle velike i sjajne kolonije okruglog oblika, glatke površine i rubova, laktoza pozitivne su izolirane kao moguće *Enterobacter sp*. Sterilnom mikrobiološkom ezom uzete su sve potencijalne kolonije porasle na odgovarajućim podlogama te je svaki uzorak prenesen na predmetnicu i proveden je postupak bojanja po Gramu kako bi se utvrdila mikromorfologija.

Gram-negativne bakterije, štapićastog oblika, nesporogene i kaspularnog izgleda su prepoznate kao potencijalne *Enterobacter sp. (*Slika 3).



Slika 3. Mikromorfologija stanice *Enterobacter sp.* - bojanje po Gramu

4.3. Biokemijska identifikacija vrsta *Enterobacter*

Sve izolate koji su svojom mikromorfologijom odgovarali vrsti *Enterobacter* smo podvrgnuli preliminarnoj kratkoj seriji biokemijskih reakcija IMVC, koja obuhvaća osnovne četiri biokemijske reakcije i to: indol, metilno crvenilo, Voges-Proskauerova reakcija i citrat test. Ukoliko je u preliminarnom testu izolat pokazao biokemijska obilježja karakteristična za vrste *Enterobacter* njegova je identifikacija je dodatno proširena primjenom API testa.

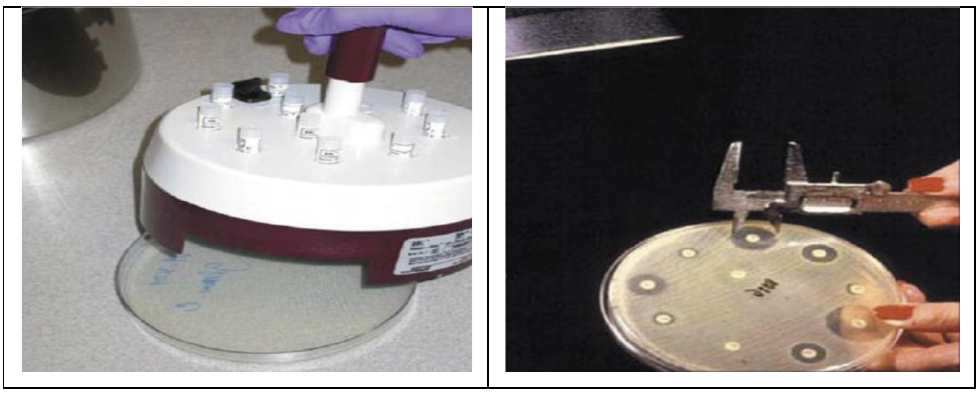
API test se koristi u mikrobiologiji kao metoda biokemijske identifikacije bakterija. Predstavlja niz od 20 biokemijskih reakcija pomoću kojih se određuju sljedeće biokemijske reakcije proizvodnje**:** oksidaze, β-galaktozidaze-ONGP, arginin dekarboksilaze-ADH, lizin dekarboksilaze – LDC, ornitindekarboksilaze – ODC, citrata, H_2S, uree, TDA, indola, acetona (Voges-Proskauer), želatinaze, kao i fermentacije. glukoze, manoze, inozitola, sorbitola, ramoze, saharoze, melobioze, amilaze, arabinoze.

4.4. Određivanje osjetljivosti na antibiotike

Fenotipska osjetljivost na antibiotike svih izolata određena je metodom disk-difuzije na Mueller-Hinton agaru prema uputama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, 2015). Postupak se sastoji od nekoliko faza kako je prikazano slici 4, a to su:

1) izolacija kolonija
2) priprema inokuluma bakterijske kulture
3) inokulacija na krutu podlogu (Mueller-Hinton agar)
4) postavljanje odgovarajućih antibiotika
5) inkubacija pripremljenih kultura na 37ºC
6) određivanje zone inhibicije rasta nakon 24 sata

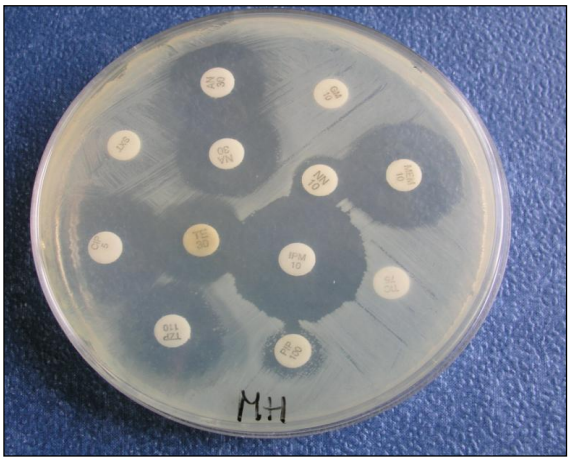




Slika 4. Određivanje osjetljivosti na antibiotike

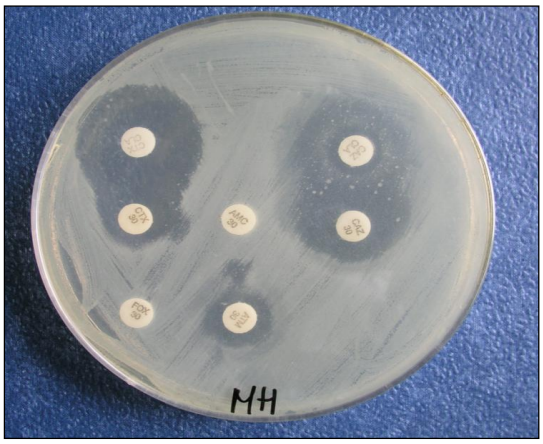
U testovima su korištene prekonoćne bakterijske kulture, gustoće 0.5 McFarland, što odgovara gustoći od 1.5 x 10^8 CFU/mL. Osjetljivost izolata *Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter gergoviae* te *Enterobacter hormaechei* je testirana na sljedeće antibiotike: ampicilin (30 µg), piperacilin (75 µg), cefotaksim (30 µg), ceftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepim (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tobramicin (10 µg), gentamicin (15 µg), amikacin (30 µg),), ciprofloksacin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), tetraciklin (30 µg) i sulfametoksazol-trimetoprim (1.25/23.75) (Slika 5).

Nakon inkubacije od 24 sata na 37ºC zone inhibicije su izmjerene i prikazane u milimetrima. Na temelju promjera zone inhibicije svi sojevi su klasificirani u tri kategorije osjetljivosti: osjetljiv (S), srednje osjetljiv (I) i otporan (R) a prema kriterijima Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, 2015).



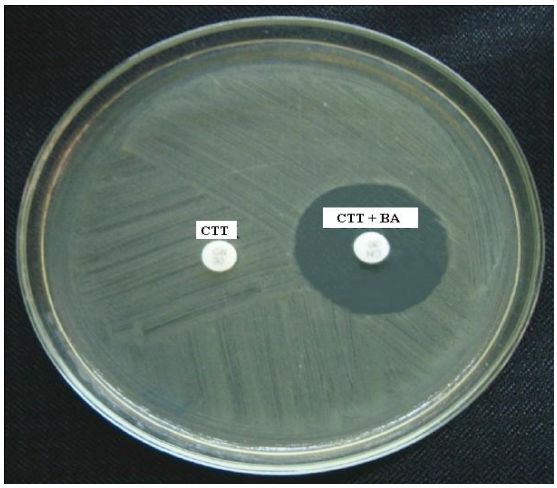
Slika 5. Metoda disk difuzije primjenjena kod *E. cloacae*

Izolati kod kojih je nakon testiranja antimikrobne osjetljivosti utvrđena rezistencija na cefalosporine (ceftazidim, cefotaksim, cefepim) su potom ispitani primjenom fenotipskog testa na produkciju beta-laktamaza proširenog spektra metodom dvostrukog diska prema uvjetima i kriterijima opisanim u Jarlier i sur. 1988., te CLSI, 2015 (Slika 6). Testiranje osjetljivosti je provedeno postavljanjem diskova ampicilina, cefotaksima, cefotaksim-klavulanat, ceftazidima, ceftazidim-klavulanat, aztreonama i cefoksitina. Vidljiva veća zona inhibicije oko diska cefotaksim-klavulanat nego oko diska cefotaksim ukazuje na prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra. Širenje inhibicijske zone oko diska cefalosporina ili aztreonama u smjeru prema centralnom disku također se smatra pozitivnim rezultatom testa.



Slika 6. Dvostruki disk (sinergistički) test izolat je pozitivan na produkciju beta-laktamaza proširenog spektra.

Za fenotipsko određivanje produkcije beta-laktamaza AmpC korišten je dvostruki-disk test (sinergistički) koji uključuje inhibitor beta-laktamaza AmpC - bornu kiselinu. Borna kiselina (120 mg) se doda otpini koja sadrži 3 mL dimetil sulfoksida i 3 mL destilirane vode (Slika 7).



Slika 7. Test za fenotipsko određivanje AmpC beta-laktamaza

Dvadeset mikrolitara otopine se stavi na disk koji sadrži 30 μg antibiotika cefoksitina (CTT). Na M-H agar se postavi disk koji sadrži cefotetan i disk koji sadrži cefotetan natopljen bornom kiselinom. Nakon inkubacije od 24 sata na 35 °C zone inhibicije su izmjerene i prikazane u milimetrima. Vidljiva veća zona inhibicije (≥ 5 mm) oko diska cefotetan/borna kiselina nego oko diska sa cefotetanom ukazuje na prisustvo beta-laktamaza AmpC.

4.5. Identifikacija gena koji kodiraju beta laktamaze proširenog sprektra pomoću PCR tehnike

Molekularna identifikacija gena koji kodiraju β-laktamaze proširenog spektra je provedena metodom lančane reakcije polimeraze (PCR, prema eng., *polymerase chain reaction)*. Za detekciju TEM, SHV i CTX-M tipa β-laktamaze proširenog spektra korištena je genomska DNA.

Izolacija nukleinske kiseline testiranih sojeva provedena je kuhanjem sojeva 10 minuta na 95ºC u sterilnoj destiliranoj vodi. Količini od 5µl pripremljenog uzorka je dodano 45µl reakcijske smjese (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, SAD), a koja je sadržavala: 18 µl sterilne destilirane vode te 25 µl PCR smjese (25 U Taq DNA polimeraze u 20 mM Tris-HCL, 100 mM KCl, 3mM $MgCl_2$, Brij 35, 0,01% (v/v), dNTP smjese (dATP, dCTP, dGTP, dTTP- svaki 0,4 mM)) i 10 µl istraživane početnice. Parovi početnica koji su korišteni u ovom radu prikazani su u Tablici 2.

Za amplifikaciju korišten je sljedeći program: inicijalna denaturacija na 94 ºC tijekom 1-3 minute; 30-32 ciklusa denaturacije na 94 ºC tijekom 40 sekundi, vezanje početnica na odgovarajućoj Tm tijekom 40 sekundi i produljenje lanca na 72 ºC tijekom 40 sekundi; konačno produljenje lanca na 72 ºC tijekom 10 minuta, nakon čega je slijedilo hlađenje i čuvanje na 4 ºC. PCR reakcije izvedene u uređaju Applied Biosystem Gene Amp PCR system 9700. Nakon amplifikacije, PCR produkti naneseni su u količini od 5 µl u 1% agarozni gel i razdvojeni elektroforezom pri jačini struje od 100 V, uz marker molekularne veličine DNK od 100 parova baza (MWM XIV, Roche). PCR produkti pročišćeni su kitom za purifikaciju (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Njemačka), a slijed nukleotida u PCR produktima određen je u DNK servisu Macrogen Inc.,Seoul, South Korea. Kompjuterska analiza redoslijeda sekvenciranih nukleotida (baza) provedena je uz pomoć programa BioEdit verzija 7.0.9. (Ibis Biosciences) i dostupnih nukleotidnih online baza podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Tablica 2. Početnice korištene u PCR reakcijama za detekciju gena koji kodiraju beta-laktamaze proširenog spektra

Tipovi Gena	**Početnice**	**Redoslijed baza (5´ →3´)**	**Veličina produkta (bp)**
TEM	TEM-A TEM-B	ATAAAATTCTTGAAGAC TTACCAATGCTTAATCA	1.075
SHV	SHV-FOR SHV-REV	TGGTTATGCGTTATATTCGCC GCTTAGCGTTGCCAGTGCT	867
PER	PER-FOR PER-REV	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA ATGAATGTCATTATAAAAGC	933
VEB	VEB-FOR VEB-REV	CGACTTCCATTTCCCGATGC GGACTCTGCAACAAATACGC	643
CTX-M-3	M13U M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	840
CTX-M-9	M9U M9L	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	850
CTX-M-2	M25U M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	850
OXA-1	OXA-1-FOR	ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	813

5. REZULTATI

5. 1. Rezultati biokemijskih obilježja identificiranih vrsta *Enterobacter*

Na istraživanim postajama u Kaštelanskom zaljevu izolirano je ukupno 54 izolata *Enterobacter sp.,* 26 na postaji u Kaštel Sućuracu, 14 na postaji u Kaštel Gomilici, te 14 na postaji u Resniku.

Pomoću API 20E testa određene su slijedeće biokemijske reakcije proizvodnje**:** oksidaze, β-galaktozidaze-ONGP, arginin dekarboksilaze-ADH, lizin dekarboksilaze – LDC, ornitindekarboksilaze – ODC, citrata, H_2S, uree, TDA, indola, acetona (Voges-Proskauer), želatinaze, kao i fermentacije glukoze, manoze, inozitola, sorbitola, ramoze, saharoze, melobioze, amilaze, arabinoze (Slika 8). Na temelju ovog testa potvrđeno je da se radi o vrstama *Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter gergoviae* te *Enterobacter hormaechei* (Tablica 3). Treba napomenuti kako rezultati koji se dobiju provođenjem API testa često nisu vjerodostojni te smo stoga proveli i dodatne metode molekularne identifikacije.



Slika 8. Rezultat biokemijske identifikacije *Enterobacter cloacae* pomoću API 20E testa

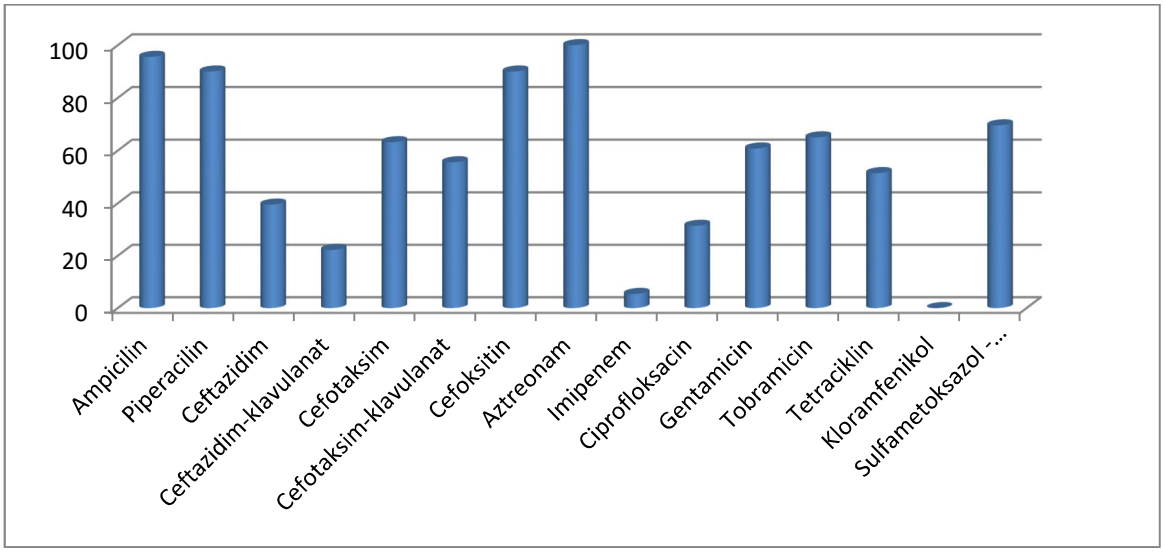
Tablica 3. Rezultati biokemijskih obilježja identificiranih vrsta roda *Enterobacter*

Biokemijske reakcije	**Identificirane vrste roda *Enterobacter***			
	E.cloacae	*E.aerogenes*	*E.gergoviae*	*E.hormaechei*
Oksidaza	-	-	-	-
β-galaktozidaza – ONGP	+	+	+	+
Arginin dekarboksilaza –ADH	+	-	-	+
Lizin dekarboksilaza- LDC	-	+	-	-
Ornitin dekarboksilaza- ODC	+	+	+	+
Citrat	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-
Urea	-	-	+	+
TDA	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
Aceton (Voges-Proskauer)	+	+	+	+
Želatinaza	-	-	-	-
Fermentacija:				
Glukoza	+	+	+	+
Manoza	+	+	+	+
Inozitol	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	-	-
Ramoza	+	+	+	+
Saharoza	+	+	+	+
Melobioza	-	+	+	-
Amilaza	+	+	+	+
Arabinoza	+	+	+	+

5. 2. Rezultati fenotipske osjetljivosti na antibiotike identificiranih vrsta *Enterobacter*

Rezultati osjetljivosti svih 54 *Enterobacter sp.* izolata testiranih na 15 antibiotika relevantnih u antimikrobnoj terapiji prikazani su na Slici 9. Svi izolati su pokazali visoku stopu rezistencije na peniciline, tako je postotak rezistencije na ampicilin iznosio 95,55%. Osim snižene osjetljivosti na peniciline ovi izolati također ne pokazuju osjetljivost prema monobaktamima, pa je rezistencija prema aztreonamu iznosila 100%. Izolati su pokazali i postojanje rezistencije na aminoglikozide kao što je gentamicin te je ona iznosila 60,78%, dok je čak 51,43% izolata posjedovalo rezistenciju prema tetraciklinu.

Stupanj rezistencije prema antibiotiku koji pripada cefalosporinima II. generacije odnosno ciprofloksacinu je iznosio 31,43%. Izolati su pokazali visoku rezistenciju prema drugom antibiotiku iz iste skupine, cefoksitinu, što pak ukazuje na postojanje beta-laktamaza AmpC. Stupanj rezistencije na cefalosporine III. generacije, cefotaksim i ceftazidim je iznosio 63,6%, odnosno 39,47%. Visoke stopa rezistencije na cefalosporine treće generacije upućuje na produkciju β-laktamaza proširenog spektra.



Slika 9. Postotak rezistencije na 15 antibiotika kod 54 izolata *Enterobacter sp.* izoliranih iz školjkaša- metoda disk difuzije

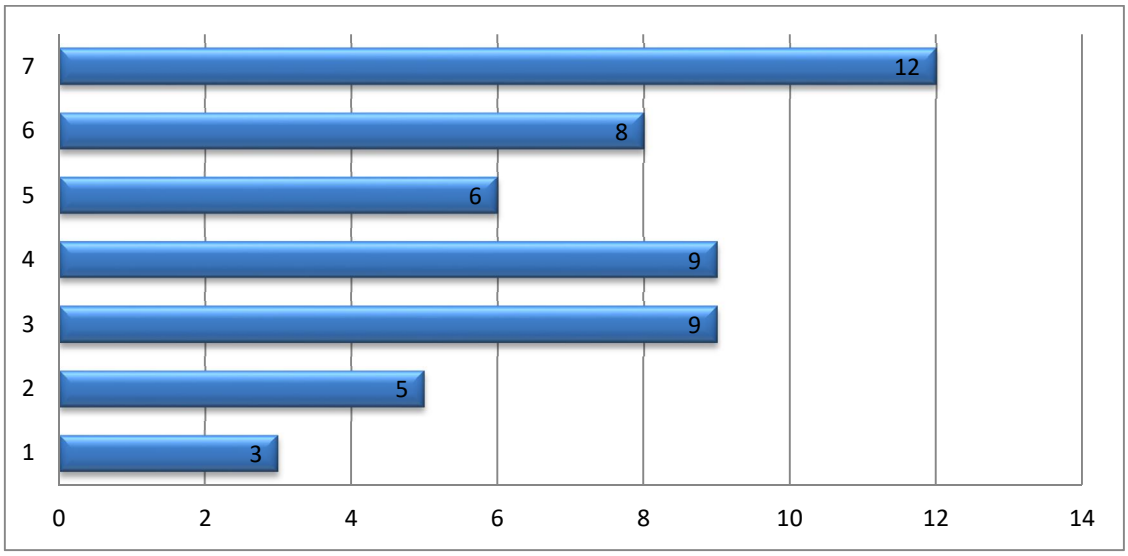
Zbog visoke rezistencije prema cefalosporinima treće generacije, ceftazidimu i cefotaksimu proveli smo metodu dvostruke disk-difuzije. Testiranje osjetljivosti je provedeno postavljanjem

diskova ampicilina, cefotaksima, cefotaksim / klavulanat, ceftazidima, ceftazidim / klavulanat, aztreonama i cefoksitina. Vidljiva veća zona inhibicije oko diska cefotaksim-klavulanat nego oko diska cefotaksim ukazuje na prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra.

Kako su neki izolati prilikom testa dvostrukog diska pokazali rezistenciju na klavulansku kiselinu, izvršili smo dvostruki-disk test (sinergistički) koji uključuje inhibitor beta-laktamaza AmpC - bornu kiselinu. Povećana zona inhibicije oko dvostrukog diska ukazuje na produkciju beta-laktamaza AmpC.

5. 3. Rezultati učestalosti i postotak rezistencije izolata *Enterobacter* na antibiotike

Učestalost rezistencije izolata *Enterobacter* na antibiotike je prikazana na slici 10. Svi izolati koji su pokazali rezistenciju na 3 i više različitih skupina antibiotika nazivaju se višestruko rezistentnima.



Slika 10. Rezultati učestalosti rezistencije izolata *Enterobacter* na antibiotike

Rezultati testiranja poklapaju se s prethodnjim tvrdnjama o višestrukoj rezistenciji bakterija iz okoliša. Najmanji postotak izolata (5,55%) je rezistentan na jedan antibiotik, dok je rezistencija

na dva antibiotika uočena kod pet izolata (9,26%). Rezistenciju na tri antibiotika posjeduje devet izolata (16,67%), isti broj izolalata pokazuje rezistenciju na četiri antibiotika (16,67%). Šest od 54 izolata posjeduje rezistenciju na pet antibiotika (11,11%), dok je kod 8 izolata identificirana rezistencija na čak šest antibiotika (14,81%). Posljednju skupinu čini 12 izolata koji posjeduju rezistenciju na sedam testiranih antibiotika (22,22%).

5. 4. Rezultati molekularne identifikacije gena u izolatima *Enterobacter sp.* koji produciraju ESBL

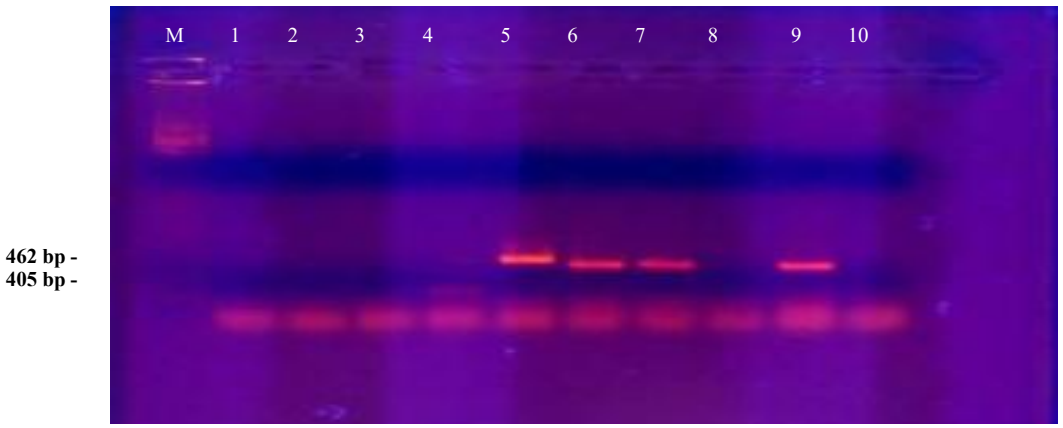
Rezultati molekularne identifikacije gena u ESBL producirajućim izolatima su prikazani u tablici 4. Metodom lančane reakcije polimeraze htjeli smo dokazati postojanje gena koji kodiraju za β-laktamaze proširenog spektra, te gena AmpC. Od 18 izolata, koliko ih je obuhvaćeno ovom metodom, njih čak 15 je pokazalo prisutstvo gena ESBL. TEM-1 posjeduje 5 izolata (33,33%), upravo ti rezultati su bili rezistentni na cefotaksim, koji pripada cefalosporinima III. generacije. TEM-1 i SHV-12 posjeduju 4 izolata (26,67%). Jedan izolat je posjedovao čak tri gena ESBL, TEM-1, SHV-12 i CTX-15, dok su samo dva izolata pokazala postojanje CTX-15 (13,33%).

Prisustvo gena AmpC odgovornih za produkciju β-lakatamaza AmpC smo uspješno dokazali u 10 izolata (55,55%). Upravo ti izolati su kod ispitivanje bakterijske osjetljivosti na antibiotike imali visoku stopu rezistencije prema cefalosporinima II. generacije, te su ujedno pokazali i rezistenciju prema klavulanskoj kiselini.

Tablica 4. Molekularna identifikacija gena ESBL i AmpC u izolatima *Enterobacter*

Vrste	Broj izolata	ESBL geni	AmpC geni
E. cloacae	61	TEM-1	
E. hormaechei	68	TEM-1	
E. cloacae	69	TEM-1	
E. intermedius	236	TEM-1	
E. cloacae	86	TEM-1, SHV-12	DHA-1
E. aerogenes	296	TEM-1, SHV-12	
E. cloacae	298	TEM-1, SHV-12	DHA-1
E. cloacae	306	TEM-1, SHV-12	DHA-1
E. intermedius	243	TEM-1, SHV-12, CTX-15,	CMY
E. agglomerans	241	TEM-1, CTX-15	
E. cloacae	244	TEM-1, CTX-15	
E. cloacae	51	TEM-1, CTX-15,	DHA-1
E. hormaechei	64	TEM-1,	AmpC
E. cloacae	62	CTX-15	
E. cloacae	73	CTX-15,	AmpC
E. cloacae	311		AmpC
E. cloacae	81		AmpC
E.asburiae	80		AmpC

Gen koji pripada porodici CMY beta-laktamaza identificiran je kod jednog izolata *E. cloacae*, a u tri izolata su pronađeni geni koji kodiraju produkciju beta-laktamaza DHA-1 (Slika 11). Sva četiri izolata su su bila rezistentna na cefalosporine, ampicilin, tikarcilin, aztreonam i sulfametoksazol-trimetropin.



Slika 11. Elektroforeza na gelu agaroze za odvajanje produkata PCR-a za gene AmpC kod različitih izolata *Enterobacter*. Linija M: marker, linije 6,7 i 9 pozitivan signal zaprisustvo gena DHA-1 i linija 5 pozitivan signal za prisustvo gena CMY

6. RASPRAVA

U ovom radu istražena je problematika povećanja rezistencije bakterija na antimikrobne lijekove, te potencijalni utjecaj istih na zdravlje čovjeka u slučaju onečišćenja okoliša.

Upravo neučinkovitost većine antimikrobnih sredstava nam ukazuje na pojavu rezistencije bakterije koja posljednjih 20 godina kontinuirano raste. Rezistencija bakterija predstavlja jedan od glavnih zdravstvenih problema današnjice jer rezultira pojavom bolesti kod ljudi, a istovremeno izbor terapije uslijed rezistencije je jako sužen. Bakterije izolirane iz onečišćenih voda pokazuju znatno veću vitalnost i imaju širu ekološku valenciju pri nepovoljnim fizikalno-kemijskim uvjetima, te tako uspješno koloniziraju morske ekosustave. Morski ekosustavi pak na takav način postaju dugotrajna izvorišta otpornih bakterija i gena koji uvjetuju rezistenciju. U takvim uvjetima fond rezistentnih mikroorganizama bi se mogao uvećati, a to opet predstavlja problem za ljude prilikom konzumiranja hrane iz mora.

Priobalno područje predstavlja najveće gospodarsko i prirodno bogatstvo u Republici Hrvatskoj. To je područje u kojem se odvijaju brojni dinamični i međuovisni procesi uvjetovani međusobnim djelovanjem mora i kopna. Nažalost, uslijed urbanizacije, prekomjernog naseljavanja priobalnih područja, te postojanja razvojnog pritiska veliki je broj negativnih utjecaja koji pak imaju posljedice na morske ekosustave. Naime, u more dospijevaju sve otpadne vode obalnog područja i šireg kontinentalnog zaleđa. Te vode su uglavnom nepročišćene ili samo djelomično pročišćene i kao takve predstavljaju značajan izvor patogenih mikroorganizama, teških metala, aromatskih ugljikovodika, ksenobiotika, radioaktivnih elemenata i drugih tvari opasnih za okoliš i zdravlje ljudi (Edge i Hill, 2005). Onečišćenjem su najčešće pogođena relativno zatvorena mora, kakvo je i samo Jadransko more. Osim otpadnih voda izvor onečišćenja mogu biti atmosfera i tlo, ispiranje tla, vjetrovi i slično.

Sljedeći važan izvor mikroorganizama su sami kupači. Utvrđeno je da upravo ta "rekreacijska" morska područja koja nisu pod utjecajem voda mogu biti onečišćena enterovirusima, bakterijama i gljivicama (Shuval, 1986). Kupanje na napučenim plažama koje su kontaminirane patogenima može biti efikasan način prijenosa bakterijskih i gljivičnih infekcija (Papadakis i sur, 1992; Feeisher u sur, 1993). Otporni patogeni mikroorganizmi svojim uplitanjem u prirodni tok hranidbenih lanaca mijenjaju životne uvjete svih karika u lancu, pa

tako i čovjeka (Wollenberger i sur, 2000). Svjedoci smo visoke incidencije infekcija u svijetu među alohtonim pučanstvom priobalnih područja i otoka, a nerijetko žrtvama infekcija bivaju i sami turisti uslijed konzumiranja hrane iz mora.

Mnoga znanstvena istraživanja u svijetu ukazuju na visoke koncentracije antibiotika u obalnim vodama mora i povećanom broju rezistentnih sojeva u njima, što je posljedica visoke godišnje proizvodnje i potrošnje antibiotika, koja se kreće između 100 000 i 200 000 tona. Postoji tek mali broj epidemioloških istraživanja koja bi argumentirano i bez dvojbe ukazala na more kao mogući izvor infekcije (Skočibušić, 1998). Istraživanja o učestalosti, načinu pojave i raznolikosti gena koji kodiraju beta laktamaze proširenog spektra, kao i o njihovoj prisutnosti u priobalnim područjima imaju značajnu ulogu u procjeni ugroženosti i otkrivanju mogućih izvora infekcije.

Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na prisutnost brojnih vrsta *Enterobacter* u priobalnim vodama Kaštelanskog zaljeva, za koje smo dokazali da su rezistentne ne samo prema penicilinima, monobaktamima, aminoglikozidima nego čak i prema svim skupinama cefalosporina. Osim što izolati posjeduju rezistenciju prema novijim skupinama antibiotika, nerijetko posjeduju rezistenciju prema više skupina antibiotika, odnosno su višestruko rezistentni. Upravo to je često karakteristika mikroorganizama iz okoliša.

Nakon što smo identificirali vrste *Enterobacter* ispitali njihovu osjetljivost na antibiotike, odabrali smo manji broj izolata koji su pokazali vjerojatnost posjedovanja gena ESBL. U ovom radu je primjenom PCR tehnike sa specifičnim početnicama provedena identifikacija gena blaTEM, blaSHV i blaCTX-M u izolatima *Enterobacter.* Postoji naime sličnost između gena koji kodiraju ESBL koje smo ovim radom identificirali u moru i onih prisutnih u izolatima iz hrvatskih bolnica što ukazuje da bi sojevi koji produciraju ESBL mogli djelovati kao posrednici u protoku gena između priobalnih područja i bolničkih sredina. Usprkos velikom broju radova o raznolikosti gena koji kodiraju ESBL u kliničkim izolatima *Enterobacter*, broj radova u kojma su opisani izolati iz okoliša je ograničen. Stoga je potrebno daljnje aktivno praćenje učestalosti takvih izolata te njihovo eventualno širenje u priobalnim područjima.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenog istraživanja određivanja antimikrobne rezistencije u vrstama *Enterobacter* i određivanja prisutnosti gena koji kodiraju za β-laktamaze proširenog spektra možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. Područje priobalnog mora Kaštelaskog zaljeva je onečišćeno urbanim otpadnim vodama fekalnog porijekla.
2. Ispuštanje nepročišćenih otpadnih voda u more uzrokuje intenzivno bakterijsko onečišćenje priobalnog mora i koncentriranje različitih vrsta *Enterobacter*.
3. Ovakvom degradacijom morskih ekosustava dovodi se u pitanje zdravstvena, nutritivna, rekreativna kao i estetska kakvoća obalnih voda.
4. Školjkaši zbog svog sesilnog načina života i filtriranja mora u sebi mogu akumulirati patogene mikroorganizme i njihove gene rezistencije, te se upravo zbog konzumacije takve hrane dovodi u pitanje zdravlje ljudi.
5. Istraživanja pokazuju da *Enterobacter sp*. dolaskom u morski okoliš, koriste raznolike fenotipske i genotipske mehanizme kako bi razvile otpornost ne samo prema nepovoljnim abiotičkim činiteljima u okolišu nego i prema antibioticima
6. Ispitivanjem fenotipske osjetljivosti ustanovili smo da izolati *Enterobacter sp.* posjeduju rezistenciju prema velikom broju antibiotika, od penicilina, preko cefalosporina I. i II. generacije, pa sve do cefalosporina III. generacije. Takvi izolati predstavljaju velik terapijski problem jer su višestruko rezistentni na sve beta-laktamske antibiotike a često i na ostale skupine antibiotika.
7. Fenotipskom identifikacijom primjenom metoda dvostrukog diska identificirano je posjedovanje gena koji kodiraju ESBL i AmpC beta-laktamaze.
8. Molekularnom identifikacijom gena pomoću tehnike PCR kod 15 izolata identificirali smo gene ESBL, a kod 10 izolata gene AmpC.
9. Rezultati ukazuju na visoki stupanj rezistencije vrsta *Enterobacter* na antibiotike kao i značaj istraživanja okoliša za bolje razumijevanje nastanka i širenja bakterija rezistentnih na antibiotike i njihovih gena a u cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja, te utvrđivanje moguće uloge ekoloških faktora u razvoju i širenju rezistencije na antibiotike u morskim ekosustavima kao mogućeg rezervoara gena rezistencije.

8. LITERATURA

1. Aravena-Román, M., Inglis, T.J., Henderson, B., Riley, T.V., Chang, B.J., (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**: 1110-1112.
2. Baquero, F., Martinez, J.L., Cantón, R., (2008). Antibiotic and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology **19**: 260-265.
3. Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., Wright, G.D., (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One **7**: 1-11.
4. Bush, K., Jacoby, G.A., (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. Antmicrobial Agents and Chemotherapy **54**: 969-976.
5. Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P., (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clinical Microbiology and Infection **18**: 413-431.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), **(**2015). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. (M100-S25).
7. Edge, T.A., Hill, S., (2005). Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. Canadian Journal of Microbiology **51**: 501-505.
8. Fleisher, J.M., Jones, F., Kay, D., Stanwell-Smith, R., Wyer, M., Morano, R., (1993). Water and non-water-related risk factors for gastroenteritis among bathers exposed to sewage-contaminated marine waters. International Journal of Epidemiology **22**: 698-708.
9. Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P., (2011). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology **50**: 477-479.

10. Gurtler, J.B., Beuchat, L.R., (2005). Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. Applied and Environmental Microbiology **71**: 7661-7669.
11. Hoffmann, H., Roggenkamp, A., (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. Applied and Environmental Microbiology **69**: 5306-5618.
12. Janda, J.M., Abbott, S.L., (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical Microbiology Reviews **23**: 35-73.
13. Jarlier. V., Nicolas, M.H., Fournier, G., Philippon, A.., (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Reviews of infectious diseases **10**: 867-878.
14. Kümmerer, K., (2004). Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **54**: 311-320.
15. Kušpilić, G., (2001). Flux of nitrogen, phosphorus and silicate between the sea water / sediment boundary in the onshore and offshore waters of the middle and south Adriatic. Ph. D. Thesis, University of Zagreb, 91 pp
16. Maravić, A., Skočibušić, M., Samanić, I., Puizina, J., (2012). Antibiotic susceptibility profiles and first report of TEM extended-spectrum β-lactamase in *Pseudomonas fluorescens* from coastal waters of the Kaštela Bay, Croatia. World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**: 2039-2045.
17. Mezzatesta, M.L., Gona, F., Stefani, S., (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiology **7**: 887-902.
18. Morand, P.C., Billoet, A., Rottman, M., Sivadon-Tardy, V., Eyrolle, L., Jeanne, L., Tazi, A., Anract, P., Courpied, J.P., Poyart, C., Dumaine, V., (2009). Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. Journal of Clinical Microbiology **47**: 2489-2495.
19. Orlić, M., Dadić, V., Grbec, B., Leder, N., Marki, A., Matić, F., Mihanović, H., Beg Paklar, G., Pasarić, M., Pasarić, Z., Vilibić, I., (2007). Wintertime buoyancy forcing, changing seawater properties and two different circulation systems produced in the Adriatic. Journal of Geophysical Research- Oceans **112**: 1–21.

20. Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C., Bacchiocchi, I., (2006). Occurrence and characterization of *Aeromonas spp.* in mussels from the Adriatic Sea. Food Microbiology **23**: 418-422.
21. Papadakis, E., Malliri, A., Linardopoulos, S., Karaiossifidi, H., Field, J., Spandidos, D., (1992). Ras and p53 expression in non-small-cell lung-cancer patients – p53 over-expression correlates with a poor prognosis. International Journal of Oncology **1**: 403-413.
22. Poirel, L., Potron, A., De La Cuesta, C., Cleary, T., Nordmann, P., Munoz-Price, L. S., (2012). Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**: 2756–2758.
23. Saunders, S., Paine-Saunders, S., Lander, A.D., (1997). Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. Developmental Biology **190**: 78-93.
24. Shuval, H.I., Yekutiel, P., Fattal B., (1986). An epidemiological model of the potential health risk associated with various pathogens in wastewater irrigation. Water Science & Technology **10**: 191–198.
25. Skočibušić M (1998) Ekologija i rasprostranjenje vrsta roda *Vibrio* u splitskom akvatoriju. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, polje Biologija
26. Tacão, M., Correia, A., Henriques, I., (2012). Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla_{CTX-M}-like genes. Applied and Environmental Microbiology **78**: 4134–4140.
27. Tambić-Andrašević, A., (2009). Antibiotic resistance control in Croatia. Croatian Journal of Infection **4**: 145-150.
28. Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B., (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clinical Infectious Diseases **39**: 309-317.
29. Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere **40**: 723-730.

30. World Health Organization (WHO)WHO Annual Report on Infectious Disease: Overcoming Antimicrobial Resistance; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010 On-Line URL: http://www.who.int/infectious-disease-report/2010/ Pristupljeno 02.6.2015.
31. Zhang, X.X., Zhang, T., Fang, H.H., (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. Applied Microbiology and Biotechnology **82**:397-414.